

## Περίληψη Παρουσίασης Webinar «Μονοξυγενάσες λυτικών πολυσακχαριτών και παραγωγή Νανοκυτταρίνης»

---

### 1. Εισαγωγή

Η κυτταρίνη υπήρξε ανέκαθεν η πιο άφθονη μορφή φυσικού βιοπολυμερούς στον πλανήτη. Εξάγεται από τα αγροτικά παραπροϊόντα και από τις ίνες των φυτών. Η κατανόηση της δομής της κυτταρίνης και ο τρόπος αποικοδόμησής της, έχει απασχολήσει την ερευνητική κοινότητα τις τελευταίες δεκαετίες. Τα ένζυμα που βιοαποικοδομούν την νανοκυτταρίνη είναι οι κυτταρινάσες, οι ημικυτταρινάσες, αλλά και οι μονοξυγενάσες των λυτικών πολυσακχαριτών (LPMOs). Η παρουσίαση αυτή θα εξετάσει τις μονοξυγενάσες των λυτικών μονοξυγενασών ως κατηγορία οξειδωτικών ενζύμων αλλά και ως ένζυμα αποπολυμερισμού της κυτταρίνης προς παραγωγή νανοκυτταρίνης. Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός της νανοκυτταρίνης, αποτελεί μια νέα και πολλά υποσχόμενη εφαρμογή, καθώς τα πλεονεκτήματα και οι χρήσεις της νανοκυτταρίνης παρατηρούνται σε πολλά επίπεδα. Είναι ένα φυσικό βιοπολυμερές πράσινης βιοτεχνολογίας υψηλής μηχανικής ανθεκτικότητας, και βρίσκει εφαρμογή στην τεχνολογία τροφίμων, στην υγεία, καθώς και στην αντικατάσταση των πλαστικών. Η παραγωγή της νανοκυτταρίνης με ενζυμική βιοκατάλυση αποτελεί την πιο οικολογική προσέγγιση και βασίζεται στα ένζυμα των μονοξυγενασών των λυτικών πολυσακχαριτών. Οι LPMOs έχουν τον κύριο ρόλο στην σύσταση των ενζύμων για την επεξεργασία κυτταρίνης και την παραγωγή νανοκυτταρίνης (Hu et al, 2018).

### 2. Μονοξυγενάσες λυτικών πολυσακχαριτών (LPMOs)

Οι μονοξυγενάσες των λυτικών πολυσακχαριτών (LPMOs) είναι οξειδωτικά ένζυμα και μπορούν να ενισχύσουν την υδρολυτική απόδοση των γλυκοζυλ-υδρολασών (GHs) κατά τη διάρκεια του αποπολυμερισμού των πολυσακχαριτών όπως η λιγνοκυτταρίνη και χιτίνη. Οι LPMOs περιγράφηκαν σχετικά πρόσφατα στην βιβλιογραφία και ο μηχανισμός δράσης τους βρίσκεται ακόμη υπό συζήτηση. Οι LPMOs είναι μεταλλοένζυμα, με ιόν μονοθενούς και δισθενούς χαλκού που συντονίζεται από δύο ιστιδίνες στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Σχηματίζοντας. Η δράση των LPMO απαιτεί την παρουσία ενός εξωτερικού δότη ηλεκτρονίων και του μοριακού οξυγόνου ή του υπεροξειδίου. Οι δότες ηλεκτρονίων μπορεί να είναι μη ενζυμικοί (όπως ασκορβικό και λιγνίνη) ή ενζυμικοί (π.χ. διυδρογενάση της

κελλοβιόζης). Η διάσπαση των β-1,4-γλυκοσιδικών δεσμών από LPMOs προκρίπτει απο την οξειδωση είτε του C1 είτε του C4 άνθρακα του δεσμού , ενώ ορισμένες LPMOs δείχνουν μικτή δραστηριότητα C1 / C4 που οδηγεί στην παραγωγή μείγματος προϊόντων C1-, C4- διπλής οξειδωσης. Οι LPMOs δρουν στην επιφάνεια της κρυσταλλικής κυτταρίνης εισάγουν νέα άκρα για την δράση των κυτταρινασών. Με βάση την πρωτοταγή δομή τους, οι LPMO ταξινομούνται επί του παρόντος σε έξι Auxiliary οικογένειες (AA) στη βάση δεδομένων. Αυτές είναι οι AA9, AA11, AA13 και AA14 που βρέθηκαν σε μύκητες, AA15 κυρίως σε έντομα αλλά και σε ιούς, και οι AA10 βρίσκονται κυρίως σε βακτήρια. Τα ένζυμα αυτά έχουν δείξει δραστηριότητα σε μια ποικιλία υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων κυτταρίνης, των β-γλυκανών της ημικυτταρίνης, και των ολιγοσακχαριτών κυτταρίνης (Villares et al, 2017).

### 3. Παραγωγή και απομόνωση Νανοκυτταρίνης

Η ανάγκη για δημιουργία ανακυκλώσιμων υλικών με χρήση της τεχνολογίας που είναι διαθέσιμη, έστρεψε το ενδιαφέρον στην νανοτεχνολογία. Έχει δοθεί έμφαση στη αντικατάσταση των προϊόντων πετρελέου, με υλικά που προκύπτουν απο βιομάζα αγροτικών παραπροϊόντων τα οποία είναι ανανεώσιμα, οικολογικά, βιοδιασπώμενα και ασφαλή. Απο την κυτταρίνη προκύπτει η νανοκυτταρίνη (NC nanocellulose). Η νανοκυτταρίνη αποτελείται απο νανοινίδια κυτταρίνης και νανοκρυστάλλους κυτταρίνης. Μπορεί να προέρχεται απο τα φυτά, από βακτήρια (βακτηριακή ή μικροβιακή κυτταρίνη) ή και από φύκη (θαλάσσια tunicate κυτταρίνη). Η μεγάλη ποικιλία των σχημάτων και του μήκους της νανοκυτταρίνης δίνει ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών στους τομείς διατροφής, βιοιατρικής, φαρμακευτικής, συσκευασίας και πακεταρίσματος. Το πλεονέκτημα της νανοκυτταρίνης είναι οτι είναι μη τοξική, βιοσυμβατή, με ανθεκτικές μηχανικές ιδιότητες, με μεγάλη αναλογία επιφάνειας/όγκου και με στροφική ικανότητα versatility. Το τελευταίο οφείλεται στις τρεις υδροξυλικές ομάδες κάθε γλυκόζης η οποία είναι η βασική μονάδα της κυτταρίνης . Τα νανοινίδια κυτταρίνης (NFC nanofibrillated cellulose) αναφέρονται στη βιβλιογραφία και ως μικροινίδια κυτταρίνης (MFC microfibrillar cellulose. Οι νανοκρυστάλλοι κυτταρίνης (CNC cellulose nanocrystals) αναφέρονται στη βιβλιογραφία και ως μικροκρύσταλοι. Η αυτο-συναρμολόγηση και η υγρή κρυσταλλική μορφή είναι μοναδικές ιδιότητες των νανοκρυστάλων κυτταρίνης. Η δομή της κυτταρίνης αποτελεί ενα πολυμερές υπομονάδων γλυκόζης οι οποίες συνθέτουν κρυσταλλικές και άμορφες περιοχές. Οι κρυσταλλικές περιοχές του πολυμερούς προκύπτουν απο δεσμούς van der Waals, δεσμούς υδρογόνου, αλλά και β-1,4-γλυκοζυτικούς δεσμούς, ενώ οι άμορφες περιοχές του πολυμερούς έχουν μόνο γλυκοζυτικούς δεσμούς και όχι δεσμούς υδρογόνου. Οι διαφορετικές πηγές κυτταρίνης επηρεάζουν τον

προσανατολισμό και τους δεσμούς υδρογόνου της κυτταρίνης. Η πράσινη χρήση της φυτικής βιομάζας για την βιομετατροπή της κυτταρίνης σε νανοϊνίδια κυτταρίνης έχει ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω της χαμηλής κατανάλωσης ενέργειας σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών. Η διάσπαση της κυτταρίνης σε κελλοβιόζη και γλυκόζη επιτυγχάνεται με τα ένζυμικό σύστημα που περιλαμβάνει μονοοξυγενάσες λυτικών πολυσακχαριτών, ενδογλουκανάσες και ξυλανάσες (Ribeiro et al, 2019).

#### 4. Χρήση των LPMOs για την παραγωγή νανοκυτταρίνης

Η χρήση των LPMOs σε πειράματα παραγωγής νανοκυτταρίνης έχει εφαρμοστεί λίγες φορές αλλά είναι πολλά υποσχόμενη. Ο συνδιασμός συγκεκριμένων ενδογλουκανάσων με LPMOs βελτιώνει την παραγωγή νανοϊνιδίων καθώς και των χαρακτηριστικών των νανοϊνιδίων. Πιο συγκεκριμένα, ενώ δεν βρέθηκαν διαφορές ως προς τις διαστάσεις και την μορφολογία των νανοϊνιδίων, οι ιδιότητές τους ήταν βελτιωμένες. Η οικογένεια AA9 περιλαμβάνει ένζυμα που αυξάνουν το αρνητικό φορτίο των ινιδίων κυτταρίνης πιθανώς λόγω εναπόθεσης καρβοξυλικών ή κετόνικών ομάδων που προκύπτουν από οξειδωτική διάσπαση. Πιθανώς επειδή αυξάνεται η δυναμική «ζ» (zeta potential) και έτσι η κυτταρίνη μετατρέπεται σε νανοϊνίδια (Ribeiro et al, 2019). Ο μηχανισμός δράσης των ενζύμων LPMOs πάνω στη λιγνινικυτταρινούχο βιομάζα αλλά και η ποιότητα της νανοκυτταρίνης που προκύπτει, αποτελεί τη βασική μελέτη της διδακτορικής μου διατριβής.

#### 5. Βιβλιογραφία

Hu, J., Tian, D., Renneckar, S., & Saddler, J. N. (2018). Enzyme mediated nanofibrillation of cellulose by the synergistic actions of an endoglucanase, lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) and xylanase. *Scientific reports*, 8(1), 3195.

Ribeiro, R., Pohlmann, B. C., Calado, V., Bojorge, N., & Pereira, N., Jr (2019). Production of nanocellulose by enzymatic hydrolysis: Trends and challenges. *Engineering in life sciences*, 19(4), 279–291.

Villares, A., Moreau, C., Bennati-Granier, C. et al. Lytic polysaccharide monooxygenases disrupt the cellulose fibers structure. *Sci Rep* 7, 40262 (2017).